

2 545 101

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

83 07208

(51) Int Cl<sup>3</sup> : C 12 P 19/04; A 23 L 1/04; A 61 K 7/00, 47/00;  
C 08 L 5/06.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 29 avril 1983.

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA RE-  
CHERCHE AGRONOMIQUE - FR.

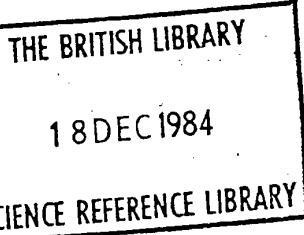
(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 44 du 2 novembre 1984.

(72) Inventeur(s) : Franciscus Maria Rombouts, Jean Fran-  
çois Thibault et Christiane Mercier.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(73) Titulaire(s) :



(74) Mandataire(s) : Harlé et Phelip.

(54) Procédé de modification des pectines de betterave, produits obtenus et leurs applications.

(57) Procédé de modification des pectines de betterave par  
réaction oxydative enzymatique.

Les produits obtenus ont des masses moléculaires plus  
élevées et peuvent former des gels aqueux.

Application à titre d'agents épaississants ou gélifiants no-  
tamment dans les industries alimentaires, cosmétiques ou  
pharmaceutiques.

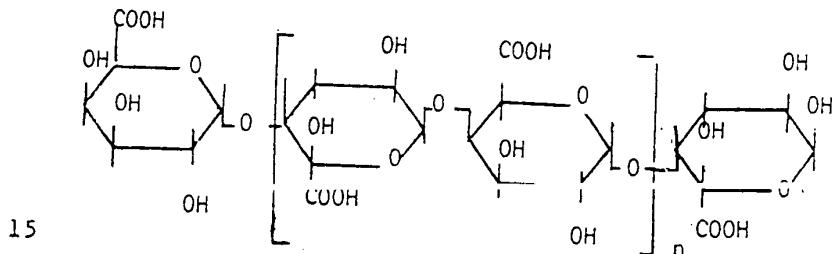
FR 2 545 101 - A1

D

L'invention concerne un procédé de modification des pectines de betterave, les produits obtenus par ce procédé et leurs applications notamment dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

5 Certaines pectines, molécules naturelles constituées d'acide polygalacturonique partiellement méthylé c'est-à-dire dans lesquelles les fonctions <sup>acides</sup> sont partiellement estérifiées par du méthanol, le motif fondamental de ces polymères répondant à la formule :

10



15

sont utilisées couramment pour former des gels aqueux ou pour épaissir différents milieux. La possibilité et les conditions de formation de ces gels dépendent essentiellement de la structure de la pectine qui est elle-même fonction 20 du végétal dont elle est extraite et du procédé d'extraction. Ainsi ne sont utilisables actuellement que les pectines extraites des pommes, et des agrumes pour préparer soit des gelées et confitures, soit des cosmétiques, ou soit des adjuvants épaississants et déshydratants de diverses compositions.

25 On sait que les pectines dites fortement méthylées, c'est-à-dire celles dont plus de 50% des groupes carboxyliques des acides galacturoniques, sont estérifiés par le méthanol gélifient en présence de saccharose et en milieu acide; 30 aussi sont-elles particulièrement utilisées pour les gelées et confitures.

35 Les pectines moins méthylées, gélifient en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , par formation de liaisons de coordinence entre les atomes d'oxygène et le cation mais la préparation de gels convenables est délicate du fait de phénomènes secondai-

res de précipitation, notamment lors de l'addition de la solution de  $\text{Ca}^{2+}$ . Certaines pectines naturelles, vraisemblablement parce qu'elles portent des substituants sur la chaîne polygalacturonique, ne peuvent former des gels par les procédés connus 5 c'est-à-dire soit en présence de saccharose en milieu acide, soit en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces connaissances sont notamment résumées dans l'ouvrage "les Polymères Végétaux polymères pariétaux et alimentaires non azotés". Bernard Monties et Claude COSTES - Editions Gauthier-Villars (1980)pp.232-251.

10 Les pectines extraites des pulpes de betterave ne forment pas de gels convenables par les procédés précédemment rappelés; on pense que la présence de groupes acétyles, estérifiant certaines fonctions hydroxyles, jouerait un rôle; comme, en outre, ces polymères naturellement ont des masses 15 moléculaires relativement faibles, ils ne peuvent être utilisés comme agents épaisseurs. C'est pourquoi, malgré l'abondance de cette matière première-la pectine constitue 15 à 20% de la matière sèche des marcs de betterave, tout comme pour les marcs de pomme-aucune utilisation industrielle 20 n'est connue actuellement. Ainsi, le procédé selon l'invention qui permet d'utiliser ces pectines après leur modification selon ce procédé, présente un grand intérêt économique, puisqu'il permet la valorisation de résidus du traitement des betteraves, notamment sucrières.

25 L'invention concerne un procédé de réticulation oxydative enzymatique des pectines de betterave qui donne des produits de masses moléculaires plus élevées, solubles dans l'eau et des gels aqueux. La réticulation est réalisée en faisant réagir un système oxydant, comprenant un agent oxydant, notamment le peroxyde d'hydrogène, en présence 30 d'une enzyme dont l'oxydant est un substrat, par exemple dans le cas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , une peroxydase. L'invention concerne aussi les pectines modifiées obtenues par ce procédé de réticulation, tout comme les gels aqueux formés par ce 35 procédé, ainsi que les applications de ces pectines modifiées et de ces gels comme agents épaisseurs et gélifiants, notamment dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Le procédé de l'invention n'a jamais été utilisé pour traiter des pectines; la Demanderesse a d'ailleurs constaté qu'il ne peut être appliqué avec succès qu'à certaines pectines et que celles issues des marcs de pomme, d'agrumes, de cerise, d'abricot ou de pomme de terre ne réticulent pas dans ces conditions; mais il donne des résultats convenables avec les pectines tirées des betteraves notamment sucrières, quelle que soit leur provenance.

Les pectines sont extraites des pulpes et marcs de betteraves selon les procédés connus en eux-mêmes et par exemple par traitement des pulpes par une solution aqueuse acide, à chaud et pendant quelques heures; par exemple par mise en contact des pulpes récupérées avec une solution diluée d'acide sulfurique de pH 1,5 à 2, à 80°C pendant 1 à 2 heures. Lorsque ce procédé d'extraction donne des solutions de pectines de concentration souhaitée, on peut effectuer directement la réticulation dans ce milieu amené au pH souhaité; autrement les pectines sont précipitées du milieu d'extraction selon des méthodes connues en elles-mêmes, puis isolées sous forme de poudres.

Selon une mise en œuvre préférée de l'invention, la réticulation enzymatique oxydative est réalisée par addition à la solution aqueuse de pectine de betterave de concentration choisie, 0,3 à 0,6 mg de peroxydase par g de pectine et de 13  $\mu$  moles à 36  $\mu$  moles environ de peroxyde d'hydrogène par g de pectine en solution aqueuse.

Les solutions diluées de peroxyde d'hydrogène étant peu stables, elles sont de préférence préparées extemporanément à partir des solutions commerciales de  $H_2O_2$  à 30%; les dilutions utilisées sont par exemple de 0,01 à 1% (vol/vol).

La peroxydase peut être d'origine animale ou végétale; on utilise avantageusement la peroxydase de Horse-radish, type I, vendue par SIGMA(USA); elle peut être soit dissoute dans la solution aqueuse, soit immobilisée sur un support insoluble et mise en contact avec le milieu réactionnel selon une manière connue en soi pour les réactions enzymatiques. Le pH des solutions aqueuses de pectine peut être compris entre environ 4 et 7; il est évidemment choisi de façon telle que l'enzyme du système oxydant ne soit pas dégradée, la limite supérieure de pH est imposée par la stabilité des pectines.

5 Selon la concentration de la solution aqueuse en pectine de betterave et la nature de celle-ci, après l'addition du système oxydant, il se forme à température ambiante en quelques minutes, soit un gel, soit une solution de viscosité accrue contenant la pectine réticulée.

10 Selon un autre aspect de l'invention, on pourra déterminer préalablement à la réticulation, quelle est la concentration convenable de la solution de pectine de départ pour obtenir, soit une solution de viscosité accrue, soit un gel, mais en général, on a trouvé qu'avec des pectines de betteraves de masse moléculaire viscosimétrique de 40 à 50 000 Dalton, de degré d'acétylation de 30 à 35% et dont la teneur en résidus de sucres neutres est de 15 à 20%, les solutions aqueuses de concentration en pectine inférieure à 15 1,5 g/100 ml ne sont pas gélifiables et que, par contre, les solutions aqueuses de concentration supérieure à 2g/100 ml donnent des gels épais. On sait que l'on ne peut, en général, pas préparer des solutions de pectine de betteraves de départ de concentration supérieure à 4g/100 ml, étant donné la solubilité aqueuse limitée des pectines.

20 Les nouvelles pectines modifiées selon l'invention peuvent être isolées des milieux aqueux où elles ont été préparées; on les précipite par addition d'un solvant à la phase aqueuse comme l'alcool, l'acétone, ou par addition de sels minéraux, on isole les précipités par filtration ou 25 centrifugation et on les sèche à pression ordinaire ou sous vide par chauffage modéré, vers 40°C. On ajoute en général au moins un volume de solvant de précipitation et de préférence environ 4 volumes. L'isolement des pectines gélifiées sous forme de poudre sèche est un autre avantage 30 de l'invention, alors que les gels de pectines de pomme ou agrume précédemment connus ne possédaient pas cette propriété. La poudre issue des gels selon l'invention, remise en présence de la quantité convenable d'eau, redonne un gel.

35 Les poudres de pectines modifiées obtenues selon l'invention peuvent être utilisées comme agents épaississants ou gélifiants; elles sont très hydrophiles et sont

capables de reprendre de grandes quantités d'eau. En particulier, on peut réaliser la préparation de produits alimentaires contenant ces pectines, tels que des desserts lactés, comme des flans préparables à température ambiante, ou encore

5 des desserts glacés; on a en effet montré que les gels selon l'invention sont parfaitement stables si on leur fait subir des cycles de congélation/décongélation de -20°C à la température ambiante. Une autre application avantageuse des pectines selon l'invention est la préparation de pommades qui, en 10 mélange avec divers principes actifs, seront utilisées dans les domaines cosmétiques ou pharmaceutiques comme excipients.

Selon une autre application de l'invention, on effectuera la gélification de la solution aqueuse à base de pectines de betterave en présence de ces principes actifs, ce 15 qui aura pour résultat la formation de produits particulièrement homogènes ou stabilisés et pourra être appliqué par exemple pour la microencapsulation d'arômes, de composés ayant une activité pharmacologique ou autre, ou pour la détoxification de certains milieux en emprisonnant par exemple 20 des métaux lourds.

Dans ce qui suit, on donnera des exemples de réalisation pour illustrer l'invention mais celle-ci ne saurait y être limitée.

#### EXEMPLE 1

25 Préparation d'une solution de pectines modifiées:

A 10 ml d'une solution aqueuse de pectines de betterave à pH 6, contenant 0,3 mg de peroxydase de Horse-radish par gramme de pectines, on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène de telle façon que l'on ait 13  $\mu$  molar d' $H_2O_2$  par g de pectines. La réticulation est terminée après quelques minutes d'agitation à température ambiante. Ce procédé a été appliqué à des solutions de différentes concentrations en pectines et la viscosité des solutions obtenues mesurées. Dans le tableau I figurent les résultats des 30 essais exprimés en viscosités intrinsèques et en masses moléculaires, calculés selon la méthode décrite par H.S. OWENS, H. LOTZKAR, T.H. SCHULTZ et W.D. MACLAY dans J. Am. Chem. Soc. 66 35 1626-1632 (1946).

TABLEAU I

Concentration g/100 ml	Viscosité intrinsèque (dl/g)	Masse moléculaire (daltons)
témoin* ;	2,48	46 000
5 0,6	4,35	70 000
0,9	4,68	73 900
1,5	4,61	73 000

\*solution aqueuse de pectine, sans addition du système réticulant.

10 EXEMPLE 2

Gélification d'une solution aqueuse de pectines de betterave :

On introduit dans 1 ml d'une solution d'une pectine de betterave (de concentration 3g/100 ml), aux environs de pH 6, 0,1 ml d'une solution aqueuse de peroxydase (de concentration 0,1 mg/ml) et 0,1 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène de concentration  $4,3 \mu$  moles par ml; on agite mécaniquement 1 à 2 minutes jusqu'à gélification. Le gel est translucide, stable, plusieurs mois à la température ambiante.

20 Dans le tableau II figurent les caractéristiques rhéologiques d'un gel préparé selon ce procédé et celles d'un gel de pectine amidée préparé selon la méthode décrite par S.A. BLACK et C.J.B. SMIT dans J. Food Science 37 726-29 (1972) à titre de comparaison.

TABLEAU II

	Module "apparent" de rigidité g/cm	Force à la rupture g	Déformation cm
30 gel pectine amidée	15,2	11,80	0,45
gel ex.2	11,6	36,3	0,67

Les mesures ont été effectuées avec un appareil INSTRON<sup>R</sup>.

35 Ces résultats montrent que le gel selon l'invention est moins "cassant" que le gel connu.

EXEMPLE 3

Préparation d'une poudre de pectines modifiées:

Un gel de pectine de betterave est préparé comme décrit dans l'exemple 2. On y ajoute 4 volumes d'éthanol à 96%, sous agitation; la pectine précipitée est isolée par filtration, puis séchée.

Le pouvoir hydrophile de cette poudre a été déterminé en mettant de la poudre en présence d'un excès d'eau, dans un récipient gradué, et en mesurant le volume du gel reformé à l'équilibre.

On obtient 110 ml de gel avec 1g de poudre de pectine de betterave préparée comme décrit ci-dessus.

REVENDICATIONS

1. Procédé de modification des pectines de betterave, caractérisé en ce que l'on fait réagir un système oxydant comprenant au moins un agent oxydant, et une enzyme admettant cet oxydant comme substrat, sur les pectines isolées de betterave .

5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le système oxydant est ajouté à la solution aqueuse de pectine, suffisamment concentrée pour qu'il se produise une gélification de celle-ci.

10 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le système oxydant est ajouté à une solution de pectine suffisamment diluée pour que la réticulation des chaînes de pectine soit ménagée et ne donne pas une gélification du milieu.

15 4. Procédé selon les revendications 2 et 3, caractérisé en ce que la pectine modifiée est isolée à l'état de poudre par addition à la solution réactionnelle d'un solvant ou un sel pour la précipiter, isolement du précipité et séchage.

20 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que l'agent oxydant est le peroxyde d'hydrogène et l'enzyme une peroxydase.

25 6. Pectines de betterave modifiées obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Pectines de betterave modifiées hydrosolubles obtenues par le procédé selon les revendications 4 et 5.

25 8. Gels aqueux caractérisés en ce qu'ils comprennent des pectines de betterave modifiées, préparées selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 5.

30 9. Gels aqueux caractérisés en ce qu'ils sont préparés par mise dans l'eau des poudres de pectines de betterave obtenues selon le procédé des revendications 2 et 4.

35 10. Application des pectines modifiées selon l'une des revendications 6 ou 7 à titre d'agents épaississants notamment de produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

11. Application des gels selon la revendication 8 ou 9, à la fabrication de produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

12. Application des pectines modifiées selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'on effectue la gélification en présence de composés nutritifs, de composés ayant une activité thérapeutique ou utilisés comme cosmétiques.